

ROGÉRIO DE FRAGA

**ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS DAS FIBRAS NERVOSAS
NA PAREDE VESICAL DE RATAS OOFORECTOMIZADAS:**

estudo estereológico

CAMPINAS

2007

ROGÉRIO DE FRAGA

**ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS DAS FIBRAS NERVOSAS
NA PAREDE VESICAL DE RATAS OOFORECTOMIZADAS:
estudo estereológico**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia,
área de concentração em Cirurgia.*

ORIENTADOR: PROF. CÁSSIO LUIZ ZANETINI RICCETTO

CO-ORIENTADOR: PROF. PAULO CESAR RODRIGUES PALMA

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA Unicamp
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F842a Fraga, Rogério de
 Alterações quantitativas das fibras nervosas provocadas pelo
 hipoestrogenismo na parede vesical de ratas ooforectomizadas: estudo
 estereológico. / Rogério de Fraga. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Cássio Luiz Zanetini Riccetto; Paulo Cesar
Rodrigues Palma
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Bexiga. 2. Estradiol. 3. Rato. I. Riccetto, Cássio Luiz
Zanetini. II. Palma, Paulo Cesar Rodrigues. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em ingles: The effect of ovariectomy and estradiol replacement on
neural fibers in the bladder of rats: a stereological study**

Keywords:

- **Bladder**
- **Estradiol**
- **Rats**

Área de concentração: Cirurgia

Titulação: Doutorado em Cirurgia

Banca examinadora:

Profº.Drº. Cássio Luiz Zanetini Riccetto

Profº Drº Carlos Arturo D'Ancona

Profª Drª Viviane Herrmann

Profº.Drº Luis Carlos de Almeida Rocha

Profª Drª Miriam Dambros

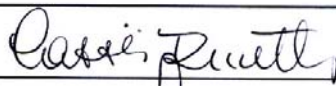
Data da defesa: 03 - 04 - 2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Cássio Luiz Zanettini Riccetto

Membros:

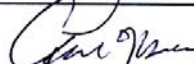
1. Prof. Dr. Cássio Luiz Zanettini Riccetto



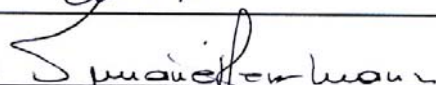
2. Prof. Dr. Luis Carlos de Almeida Rocha



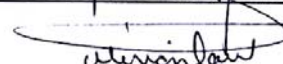
3. Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona



4. Prof^a. Dr^a. Viviane Herrmann Rodrigues



5. Prof^a. Dr^a. Miriam Dambros



Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/04/2007

DEDICATÓRIA

*À Luciana,
minha esposa,
Pois o amor basta-se a si mesmo!*

*Ao meu filho Arthur,
Pela alegria e força que trouxe ao meu espírito,
Pela semente de renovação!*

*Aos filhos que ainda estão por vir,
Por serem um “Norte” novo na velha caminhada...*

*À minha família,
Pela grandeza divina
Que isso representa!*

Ao meu orientador, Dr. Cássio Luís Zanetini Riccetto, pelos ensinamentos, pela amizade, pela demonstração de espírito científico elevado e pela dedicação aos Pós- Graduandos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Palma, gratidão eterna pelo exemplo. “...o verdadeiro sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente!” GKG

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Jr, por haver me acolhido em seu serviço e concedido a oportunidade de realizar este trabalho na Disciplina de Urologia.

À Dra. Miriam Dambros, pela amizade e pela incondicional motivação na realização de pesquisas científicas. Meu especial agradecimento pelo companheirismo e pela dedicação.

Ao Dr. Luiz Edison Slongo, amigo de todas as horas, pela orientação desde meus primeiros dias como profissional.

Ao Dr. Luis Carlos de Almeida Rocha e Dr. Renato Tâmbara Filho, pela acolhida em seu Serviço na Universidade Federal do Paraná.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pela acolhida em seu laboratório de Morfometria e Morfologia na Universidade Estadual do Rio de Janeiro e pelas orientações para a realização da Estereologia.

À Prof. Viviane Herrmann, pela amizade e incentivo em todas as fases de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Vassallo e Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto, pela orientação e pela dedicação em todas as fases deste experimento.

À Sra. Alice Adelaide, pela inestimável amizade e incentivo.

Ao Prof. Cássio Menezes Raposo do Amaral, por permitir o alojamento dos animais do estudo no biotério do Hospital SOBRAPAR.

À FAEPEX, pela concessão de auxílio financeiro na aquisição dos materiais necessários para a pesquisa.

A todos os funcionários do laboratório de patologia experimental do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher - CAISM, em especial à Srta. Marisa de Almeida Matissura, pelo auxílio na preparação das lâminas.

Ao laboratório de anatomia patologia experimental, pelo auxílio na preparação das lâminas para o estudo anatomopatológico.

Ao médico-residente Ricardo Miyaoka, pela participação e colaboração em todas as fases deste experimento.

Aos professores, residentes e pós-graduandos da Disciplina de Urologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, cuja colaboração quotidiana foi indispensável para que este trabalho se tornasse realidade.

Aos professores e funcionários da sub-comissão de pós-graduação em Cirurgia, em especial e Sra Vera Maria Barbosa

Aos amigos, Paulo Kotze, Paulo Henrique Migliari Carvalho, Fernando Meyer, Cyro César de Oliveira e Ney D'Almeida Faria Neto, pelo incentivo, companheirismo e solidariedade.

*“Vós conversais quando deixais de estar em paz
com vossos pensamentos.*

*E quando não podeis mais viver na solidão de vosso coração,
procurais viver nos vossos lábios,
e encontrais então uma diversão e um passatempo
nas vibrações emitidas...”*

Gibran Khalil Gibran

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO	16
2- OBJETIVOS	20
3- REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1- Mecanismo de ação do estrogênio no trato urinário feminino	23
3.2- Aspectos gerais da inervação intrínseca da bexiga urinária	27
3.2.1- Inervação motora.....	27
3.2.2- Inervação sensitiva.....	27
3.2.3- Gânglios autômicos.....	28
3.2.4- Paragânglios.....	29
3.3- Alterações na inervação vesical	29
4- MATERIAIS E MÉTODOS	32
5- RESULTADOS	43
6- DISCUSSÃO	47
6.1- Aspectos gerais do envelhecimento vesical na mulher	48
6.2- Ação estrogênica, colágeno, envelhecimento vesical e alterações neurológicas vesicais	49
6.3- Considerações sobre o modelo experimental	51
6.4- Aspectos gerais do método estereológico	51

6.5- Comentários sobre os achados estereológicos.....	54
6.6- Perspectivas.....	55
7- CONCLUSÕES.....	57
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9- ANEXO.....	66
10- APÊNDICE.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

β	beta
α	alfa
μm	micrômetro
μg	micrograma
Kg	Kilograma
ml	mililitro
p	significância estatística
g	grama
mg	miligrama
mm^3	milímetro cúbico
pg	picograma
%	percentagem

	PÁG.
Figura 1- Procedimento de ooforectomia.....	35
Figura 2- Exérese da bexiga no nível do colo vesical.....	36
Figura 3- Demonstração do método de pesagem de Scherle.....	37
Figura 4- Bexiga estendida sobre espátula de madeira para facilitar fixação em formalina a 10%.....	38
Figura 5- Fotomicrografia da parede vesical corada com anticorpo policlonal S-100 com fibras nervosas em marrom escuro.....	40
Figura 6- Grade do Sistema G50, para avaliação estereológica.....	42

RESUMO

O período após a menopausa é associado com elevada incidência de sintomas no trato urinário baixo. Dentre os principais, destaca-se a síndrome da bexiga hiperativa e infecções urinárias recorrentes. Há uma dificuldade para separar os fatores relacionados à senescência daqueles associados com a menopausa, que podem interferir no aparecimento das disfunções miccionais na mulher idosa. A alteração mais significativa na menopausa é a deprivação estrogênica. Esta condição tem sugerido a indicação de estrogênioterapia no período pós-menopausa, com a finalidade de reduzir a sintomatologia urinária. Porém, as repercussões do hipoestrogenismo no trato urinário inferior ainda permanecem por ser estabelecidas.

Este estudo foi conduzido utilizando-se 40 ratas Wistar (3 meses de idade) divididas em 4 grupos de 10 animais: Grupo 1: controle; Grupo 2: submetido à ooforectomia bilateral e após 4 semanas iniciada reposição sub-cutânea diária de 17 β -estradiol durante 12 semanas; Grupo 3: procedimento *SHAM* e após 4 semanas iniciada reposição diária sub-cutânea de óleo de sésamo por 12 semanas e Grupo 4: submetidas à ooforectomia bilateral e sacrificadas após 12 semanas sem reposição hormonal. Foi utilizada técnica de imunohistoquímica para coloração das lâminas com anticorpo policlonal S-100. A aferição da densidade volumétrica das fibras nervosas na parede vesical foi efetuada através da estereologia utilizando-se o sistema – teste G50.

As ratas do Grupo IV, submetidas à ooforectomia sem reposição hormonal, apresentaram densidade volumétrica de fibras nervosas menor que os outros grupos ($p < 0.001$ - teste de Newman-Keuls). Nos outros parâmetros analisados não houve diferença.

A ooforectomia bilateral, em ratas, causou diminuição da densidade volumétrica de fibras nervosas vesicais. A administração de estradiol, no grupo castrado, apresentou diferença significativa nos parâmetros estereológicos analisados, em relação aos animais castrados sem reposição ($p < 0,001$).

Palavras-chave: bexiga; estradiol; ratas.

ABSTRACT

The postmenopausal period is associated with a high incidence of symptoms in the lower urinary tract. The main urological bladder symptoms are urge incontinence and recurring urinary tract infections. It is hard to separate the influence of aging from that of menopause when studying the etiology of dysfunction in elderly women. The most significant result of menopause is estrogen deprivation. This fact has led to the use of hormonal replacement in postmenopausal women with lower urinary tract dysfunction. However, the best treatment in terms of type, dosage and method of estrogen administration has still not been defined.

This study was conducted on 40 Wistar rats (3 months old). Group 1: remained intact; Group 2: underwent bilateral ovariectomy and after 4 weeks daily replacement of 17 β -estradiol for 12 weeks; Group 3: sham operated and after 4 weeks daily replacement of sesame oil for 12 weeks and Group 4: underwent bilateral ovariectomy and were sacrificed after 12 weeks. It was used imunohistochemistry evaluation using S-100 polyclonal antibody to stain the fibers on parafin rat bladder sections. The G50 stereological grid system was used to analyze the fibers.

Ovariectomy had a decrease effect on the volumetric density of the neural fibers in the bladder wall. Estradiol replacement in castrated animals demonstrated a significative difference in the stereological parameters when compared to the castrated group without hormonal replacement.

Long-term estrogen deprivation caused significant changes in bladder innervation, which can be characterized by a decreased number of nerves fibers by 65% ($p < 0.001$).

Key Words: bladder; estradiol; rats.

1- INTRODUÇÃO

A presença de receptores para estrogênio tem sido demonstrada no trato urinário feminino (Eika et al., 1990). Estes receptores foram encontrados no trígono vesical e na uretra feminina (Blakeman et al., 2000). Entretanto, a concentração dos receptores na uretra é significativamente menor do que a concentração no útero. Devido a esta distribuição heterogênea dos receptores, há variações na sensibilidade e resposta aos níveis circulantes de estrogênio (Ekstrom, 1993).

O período após a menopausa é associado com aumento da incidência das disfunções do trato urinário inferior (Cardozo e Kelleher, 1995) A identificação de receptores estrogênicos no trato urinário têm justificado o emprego da reposição estrogênica no tratamento destes sintomas.

As alterações quantitativas e qualitativas das terminações nervosas entre os fascículos musculares da parede vesical promovem disfunções nas propriedades fisiológicas da bexiga, levando a distúrbios miccionais, principalmente em mulheres acima de 50 anos (Susset et al., 1978).

Dentre as disfunções vesicais presentes no período pós-menopausa, a bexiga hiperativa está descrita como uma das mais frequentes. A Bexiga Hiperativa é uma síndrome que envolve sintomas de urgência, polaciúria e incontinência urinária associada à urgência na qual não se detecta uma causa em torno de 90% dos casos. Diferentes modalidades de tratamento têm sido empregadas. Entretanto, os índices de remissão em longo prazo são baixos, em grande parte conseqüência do conhecimento fugaz da fisiopatogenia desta entidade.

A bexiga é composta pelo detrusor, que durante o enchimento vesical, o detrusor gradualmente relaxa para acomodar o aumento de volume urinário. Quando ocorre falha neste processo, sintomas de urgência miccional e incontinência urinária associada à urgência podem ocorrer, caracterizando a Bexiga Hiperativa. Esta entidade representa um importante problema social, higiênico e psicológico para a população acometida (Abrams et al., 1990). A prevalência desta síndrome varia de 4,5 a 53% nas mulheres e 1,6 a 24% nos homens, sendo que há um aumento significativo com a idade, atingindo cerca de 60% da população acima de 65 anos (Resnick et al., 1989; Geirsson, 1993).

Não há ainda consenso sobre os mecanismos que levam às contrações vesicais involuntárias ou à percepção anormal do enchimento vesical. Em torno de 90% dos casos de hiperatividade são diagnosticados como idiopáticos (Jabs & Stanton, 2001). Estudos têm demonstrado diferentes mecanismos levando ao aumento da atividade aferente, decréscimo do controle inibitório no sistema nervoso central ou nos gânglios periféricos, e aumento da sensibilidade das células do músculo liso vesical aos neurotransmissores oriundos de fibras eferentes. Testes neurológicos revelam que pacientes com hiperatividade idiopática não apresentam anormalidades nas vias sensoriais e motoras e, portanto, a disfunção tem origem, teoricamente, dentro da parede da bexiga ou envolve alterações na interpretação cortical das sensações (Jabs e Stanton, 2001). Patrone (2000) sugere a expressão de diferentes fenótipos neuronais a partir da ativação tissular de receptores de estrogênio α e β . Lee et al. (2001) descreveram o papel do estradiol no sistema nervoso, no qual está associado com a diferenciação e proliferação celular; sobrevivência neuronal; sinaptogênese; neuroproteção; homeostase do cálcio e atividade antioxidante.

O método de escolha para obter a estimativa morfométrica das fibras foi a estereologia, devido à maior sensibilidade do método em relação aos sistemas de avaliação quantitativa através da análise de imagem ou de programas de computador. (Mathieu et al., 1981; Cotrin et al., 1990). A densidade volumétrica é um parâmetro estereológico cujos resultados são confiáveis, em decorrência da pequena variação dos mesmos, independentemente do preparo histológico do material e da experiência do pesquisador. (Cruz-Orive e Weibel, 1990).

A estereologia é uma ciência que tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais, valendo-se da geometria e da estatística para esta aferição. Delesse (1848) lançou as primeiras idéias que serviram a fundamentação da estereologia, provando que a relação entre as áreas de determinado mineral na superfície de corte da rocha é a mesma daquela que existe entre o volume do mineral e volume total da rocha. A maior parte dos estudos estereológicos obtém dados diretamente da microscopia ótica e microscopia eletrônica, trazendo como resultado a possibilidade de elucidação das composições celulares e teciduais.

Em decorrência do pouco conhecimento acerca do papel do sistema nervoso na etiopatogenia das disfunções vesicais, e pelo fato das mesmas ocorrerem predominantemente no período no qual o nível estrogênico encontra-se diminuído, este projeto foi desenvolvido, a fim de estudar a possível alteração quantitativa nas terminações nervosas vesicais em ratas ooforectomizadas.

2- OBJETIVOS

Determinar a influência da ooforectomia e da reposição de estradiol na densidade volumétrica das fibras nervosas da parede vesical de ratas, através de parâmetros estereológicos.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- Mecanismo de ação do estrogênio no trato urinário feminino

A influência dos estrogênios no trato urinário tem sido estudada há vários anos. Salmon et al.,(1941) relataram melhora da incontinência e dos sintomas irritativos urinários em 12 pacientes tratadas com injeções intramusculares de benzoato de estradiol e dipropionato de estradiol.

Uma condição indispensável para que um tecido responda aos estímulos estrogênicos é a presença de receptores específicos em sua estrutura. Uma grande afinidade aos receptores de estrogênio foi encontrada por Lindskog et al. (1980) na uretra de ratas e por Batra e Iosif (1983) na uretra e bexiga de coelhas, nas quais verificaram concentração média 10 a 20 vezes menor que o útero.

A presença de receptores para estrogênio na uretra e bexiga humana feminina foi, primeiramente, demonstrada por Iosif et al. (1981), localizados no detrusor, uretra e trígono. Ingelman–Sundberg (1981) confirmou a presença de receptores para estrogênio no tecido urogenital, encontrando-os na bexiga, uretra, musculatura pubococcígea, em concentrações similares às encontradas no tecido vaginal.

Os receptores encontrados no trato urinário são potencialmente sensíveis à ação estrogênica em todas as fases do ciclo menstrual, em contraste com o endométrio e a vagina, que apresentam uma expressão cíclica (Sjobert et al., 1989). Este dado sugere que o trato urinário permanece receptivo à influência hormonal, independentemente dos seus níveis.

Os receptores para estrogênio encontram-se distribuídos nos tecidos do trato urinário inferior, que contém epitélio escamoso, incluindo as células transicionais no trígono e na uretra proximal com mudanças metaplásicas, entretanto não foram detectados no epitélio transicional normal (Blakeman et al., 2000). Makela et al., (2000), investigando o epitélio da bexiga e da uretra em ratas, verificaram que estes locais expressavam receptores do subtipo beta mRNA, enquanto o tecido conjuntivo vesical expressava receptores do subtipo alfa mRNA, levando-se a considerar a hipótese de que a ação hormonal apresenta diferenças de acordo com o tecido analisado. A caracterização precisa

das regiões onde os receptores estão presentes, associada ao conhecimento dos subtipos de receptores, pode auxiliar na compreensão das diferentes manifestações da ação hormonal no trato urogenital.

A mucosa vaginal, uretral e trigonal são sensíveis aos estrógenos e apontam variações de suas estruturas, dependendo dos níveis séricos deste hormônio que promove proliferação da mucosa vaginal e aumento do fechamento uretral, para evitar perdas urinárias (Miodrag et al, 1988).

Os baixos níveis de estrógenos levam ao aumento da incontinência urinária, urgência, polaciúria e infecção urinária de repetição, provocados por mudanças no pH da uretra e vagina, além da atrofia urogenital (Klutke e Bergman, 1995; Wehba et al., 1997). Miodrag et al. (1988) demonstraram diminuição do volume das fibras colágenas no tecido conjuntivo parauretral e nos ligamentos do assoalho pélvico, contribuindo para o decréscimo da pressão uretral e fraqueza ligamentar, que pode contribuir para o surgimento de incontinência urinária e prolapso uterovaginal nas mulheres pós-menopausa.

Hashimoto et al. (1999) detectaram, em coelhas castradas, diminuição da densidade do tecido conjuntivo da bexiga. Estes achados divergem dos resultados encontrados por Diep et al. (1999), que, analisando as fibras colágenas da parede vesical de coelhas em relação aos níveis de estrogênio, observaram que a ooforectomia não induziu a modificações na concentração do tecido conjuntivo

Ainda contrariando os achados acima, Susset et al. (1978) observaram aumento significativo do conteúdo de colágeno vesical em mulheres acima de 50 anos. Desta forma, verificou-se que a literatura demonstra ampla variabilidade de mudanças estruturais e funcionais induzidas pelo estrogênio, dificultando a caracterização precisa da ação deste hormônio sobre o trato urogenital feminino.

Estudos experimentais em ratas demonstraram que a ooforectomia promoveu redução do fluxo urinário máximo, aumento da pressão uretral de abertura durante a micção e redução da estimulação colinérgica na musculatura detrusora (Diep et al., 1999), comprometendo a micção. Os baixos níveis de estrogênio levaram à redução da força

contrátil da musculatura estriada do assoalho pélvico, estrutura responsável por um terço da pressão de fechamento uretral. Concomitantemente, houve declínio do tônus muscular liso em decorrência da diminuição da sensibilidade dos receptores alfa-adrenérgicos e da densidade das fibras nervosas na musculatura uretral e vesical (Diep et al., 1999).

Uma metanálise de 72 artigos mostrou um número pequeno de estudos controlados e randomizados utilizando terapia com estrogênio na incontinência urinária (Zulio et al., 1998). Foram encontrados resultados diferentes quando comparadas às respostas objetivas e subjetivas que, segundo os autores, poderiam ser explicados por uma ação estrogênica fugaz e não registrada por parâmetros clínicos e instrumentais ou utilização de metodologia deficiente para coletar os dados subjetivos (Brown et al., 1999).

Sartori et al. (1995), em estudo clínico, demonstraram em grupo de mulheres no período pós-menopausa, que receberam durante três meses estrogênio conjugado, aumento da capacidade cistométrica máxima e do fluxo médio. Estas pacientes também apresentaram decréscimo da urina residual e da frequência miccional diurna e noturna. Fantil et al. (1996) em estudo semelhante, não constataram diferenças entre os sintomas clínicos de incontinência urinária e qualidade de vida após três meses com estrogenoterapia.

Os hormônios sexuais, e os estrógenos em especial, exercem importantes efeitos no trato urinário feminino, desde os ureteres até a uretra distal, além de exercerem grande influência nas estruturas do assoalho pélvico. Alterações clínicas e urodinâmicas são evidentes no trato urinário durante a gravidez, ciclo menstrual e após a menopausa, pois uma grande afinidade para com receptores de estrogênios tem sido identificada na bexiga, trigono vesical, uretra e musculatura pubococcígea. Esta dependência de estrogênios nos tecidos do trato urinário inferior contribui para aumento significativo dos problemas urinários a partir do climatério. (Miodrag et al, 1988).

O declínio dos constituintes do tecido conjuntivo no período pós-menopausa, principalmente o colágeno da região parauretral, bem como dos ligamentos, musculatura pélvica, bexiga e vagina contribui para o aparecimento de incontinência urinária, disfunções miccionais e prolapsos urogenitais. (Versi et al., 1984).

Leclair et al., (2002) descreveu algumas alterações no sistema urogenital feminino neste período, produzindo maior taxa de sintomas urinários como aumento da frequência, urgência, infecções urinárias de repetição e incontinência. Embora esteja claro que estas alterações são causadas por uma combinação entre o envelhecimento fisiológico dos órgãos e os efeitos do decréscimo dos níveis de estrogênio, ainda permanece por ser determinada a exata contribuição de cada um, havendo particular interesse na elucidação do papel da deficiência estrogênica no aumento da incidência de infecções de repetição e incontinência urinária nas mulheres após a menopausa.

A taxa de infecção urinária aumenta com a idade: 5% em mulheres com 45 a 54 anos; 10% entre 55 a 64 anos; e 15% em mulheres com mais de 65 anos (Schaffer, 1996). Possíveis causas incluem alterações no esvaziamento vesical, aumento do resíduo pós-miccional, aumento da taxa de incontinência urinária e fecal associados a higiene perineal precária sendo a perda da camada de glicosaminoglicanos acompanhada por maior suscetibilidade à invasão de bactérias (Hextall, 2000; Klutke e Bergman, 1985)

A prevalência da incontinência urinária varia, de acordo com a experiência de vários autores. Yarnell et al., (1981), a verificaram em 42% das mulheres entre 18 e 64 anos, atingindo até 59% das mulheres com idade superior a 75 anos. Brocklehurst (1990) relatou uma incidência de 10 a 20% nas mulheres idosas que vivem em comunidade, elevando-se este índice para 50% nas mulheres institucionalizadas.

A estrogênioterapia apresenta-se na literatura médica associada ao controle da sintomatologia do climatério e suas repercussões, como na osteoporose (Kulak & Bilezikian, 1998), auxiliando no ganho de massa óssea; no tratamento de disfunções sexuais, na prevenção de doenças cardiovasculares e metabolismo lipídico; nas alterações de humor e da função cognitiva. Além disso, algumas linhas de pesquisa apresentam evidência de que a estrogênioterapia pode aliviar os efeitos e o aparecimento da doença de Alzheimer (Miller e Franklin, 1999).

3.2- Aspectos gerais da inervação intrínseca da bexiga

3.2.1- Inervação motora

A bexiga é suprida por fibras nervosas autonômicas, que formam um plexo denso entre as fibras musculares lisas do músculo detrusor. A maioria dos nervos autonômicos do detrusor são considerados colinérgicos (Dixon et al., 2000) e a contração normal do detrusor humano é mediada, quase que exclusivamente, por meio da estimulação de receptores muscarínicos, através da liberação da acetilcolina.

Há, também, a ação do óxido nítrico sintetase e do neuropeptídeo Y, que estão localizados associados a nervos colinérgicos (Dixon et al., 2000). O detrusor humano também apresenta suprimento de nervos noradenérgicos, que têm distribuição mais difusa do que os primeiros. Embora nervos deste tipo geralmente acompanhem a vascularização da bexiga, raramente se estendem entre as células musculares do detrusor.

Além disso, há evidências da ocorrência de transmissão não-adenérgica e não-colinérgica no trato urinário baixo, com padrões excitatórios ou inibitórios ainda não completamente estabelecidos.

Há, também, a ação de alguns neuropeptídeos, incluindo o peptídeo vasoativo intestinal, porém, sua função precisa como neurotransmissor ou neuromodulador permanece por ser definida.

3.2.2- Inervação sensitiva

A bexiga é suprida por nervos aferentes que trafegam pela via do nervo hipogástrico e esplâncnico pélvico (Vaughan, 1995). Os corpos celulares localizam-se no gânglio dorsal da região lombosacral e não há referência de neurônios aferentes dentro da própria bexiga. Um grupo menor de nervos sensitivos se estende do esfíncter uretral estriado através do nervo pudendo. Os nervos sensitivos suprem a bexiga são finamente mielinizados ou são fibras amielínicas e têm o aspecto de terminações nervosas livres.

A função da população de nervos aferentes é produzir uma adaptação lenta à tensão dos receptores de uma maneira gradual. Os mesmos nervos também respondem à contração vesical, indicando que a tensão assim como a viscoelasticidade é um estímulo efetivo. Além disso, a bexiga apresenta nociceptores, que são tipicamente amielínicos e respondem a estímulos associados a lesões tissulares, como processos inflamatórios e isquemia. Os nociceptores também respondem ao frio, mas não à distensão dentro de parâmetros fisiológicos. (Vaughan, 1995).

Há outros nervos sensitivos na bexiga humana, porém estes representam menos de 5% da inervação vesical total e são restritos na sua distribuição. As projeções das fibras sensitivas na bexiga humana têm papel importante como receptores de tensão. Além disso, as fibras podem atuar como receptores tácteis na parede vesical ou uretral, ou ainda como quimiorreceptores do conteúdo urinário. Os nervos sensitivos que suprem a bexiga exibem uma plasticidade marcante, podendo apresentar ramificações colaterais e a formação de conexões aberrantes que podem ocorrer como resultado de lesões, traumatismo ou inflamações.

3.2.3- Gânglios autonômicos

Pequenos conjuntos de glânglios autonômicos podem ocorrer através de todas as regiões da parede vesical, sendo especialmente numerosos na adventícia da base vesical. Estes neurônios intramurais junto com aqueles da população do plexo vesical consistem de diferentes tipos de neurônios com características histoquímicas diferentes. Um tipo contém noradrenalina e corresponde ao neurônio noradenérgico e, além disso, há nervos pré-ganglionares colinérgicos excitatórios. Alguns gânglios também recebem terminações noradenérgicas possivelmente inibitórias. Estudos recentes têm demonstrado que estes neurônios, associados ao trato urinário baixo, são muito mais complexos do que se acreditava anteriormente.

3.2.4- Paragânglios

Somando-se aos gânglios autonômicos encontram-se numerosos para-gânglios em associação à bexiga urinária humana, sendo especialmente óbvios na fase fetal tardia ou no período pós-natal precoce. Estes paragânglios estão localizados entre as ramificações do plexo pélvico e o constituinte celular recebe uma inervação autonômica direta. Muitos dos paragânglios contêm corpúsculos sensitivos parecidos com pequenos corpúsculos de Pacini, porém, a significância funcional desta associação ainda permanece obscura. As células paragângliônicas são ricas em catecolamina (Philips, 1983) e, em consequência, contém em larga escala a dopamina beta hidroxilase.

3.3- Alterações na inervação vesical

Muitos estudos relatam a associação do aparecimento de sintomas urinários relacionados à integridade neuronal. Van Poppel et al. (1989) descreveram alterações na densidade nervosa do estroma e da túnica muscular em biópsias vesicais, utilizando a metodologia de imunohistoquímica e utilizando o anticorpo S-100, através do qual verificaram um padrão diferente de densidade nervosa em cada uma destas camadas, corroborando a confiabilidade desta técnica para variação dos padrões das disfunções neurogênicas e não neurogênicas da bexiga.

Mathews et al, (1999), descreveram o padrão de inervação de recém-nascidos com extrofia vesical através de biópsias vesicais e por meio da avaliação imunohistoquímica, utilizando o anticorpo policlonal S-100. A média de fibras nervosas mielinizadas por campo foi significativamente reduzida quando comparada aos controles normais.

Alguns estudos têm observado a associação de anormalidades da matriz colágena e a manutenção da integridade das fibras nervosas. A integridade neuronal determina a contratilidade apropriada do músculo detrusor e, possivelmente, modificações no metabolismo da matriz colágena podem estar associadas com danos na inervação vesical.

O desenvolvimento normal do sistema nervoso central e periférico humano é um processo complexo que envolve uma grande variedade de fatores desde o período fetal, passando pela fase adulta até a senescência. No nível celular uma interação apropriada entre a matriz extracelular, proliferação celular, controle da apoptose e ação de uma grande variedade de expressões genéticas são necessárias para o desenvolvimento e manutenção normais do sistema nervoso periférico. O crescimento do sistema nervoso periférico é regulado por componentes da matriz extracelular. Embora a laminina seja o principal componente extracelular, há outros componentes que também apresentam papel significativo, entre eles o colágeno I e IV, que têm sido demonstrados como substratos efetivos no crescimento neuronal além de influenciarem diretamente a mielinização dos nervos periféricos.

Neste contexto (Fraga et al., 2003) demonstraram modificação significativa da densidade volumétrica do colágeno IV da membrana basal de ratas submetidas à ooforectomia bilateral e também o controle deste fenômeno associada e reposição de 17 β -estradiol.

Charlton et al. (1999) descreveram alterações focais no tecido nervoso muscular e conjuntivo na bexiga de pacientes normais e com hiperatividade detrusora e, através de imunohistoquímica utilizando o anticorpo policlonal S-100, detectaram a relação do tecido nervoso e reposição colágena.

De outra forma, nas bexigas com hiperatividade idiopática ou neuropáticas, podem ser identificadas três regiões: a primeira aparece com características normais com numerosas terminações nervosas; a segunda região tem pouco tecido conjuntivo e poucas terminações nervosas e; a terceira região, que não apresenta terminações nervosas. No tecido da bexiga hiperativa idiopática foi encontrado significativamente menos terminações nervosas, quando comparadas à bexiga dos controles normais. É bem conhecido o fato de que modificações associadas ao envelhecimento produzem variações na densidade volumétrica do tecido conjuntivo e inervação da parede vesical (Charlton et al., 1999). Nesta análise, estas áreas de variação morfológica podem representar regiões danificadas, que contribuem para o processo de hiperatividade detrusora, embora na amostra com

neuropatia tenha sido demonstrada maior severidade da lesão algumas áreas da bexiga com hiperatividade idiopática são indistinguíveis das amostras obtidas dos controles normais.

Gilpin et al. (1986) sugerem que a densidade volumétrica de fibras nervosas diminui com o aumento da idade. Diep & Constantinou (1999) descreveram o impacto dos hormônios sexuais bem como seu papel na organização do sistema nervoso central e periférico. Alvos importantes dos esteróides são o gânglio pélvico que supre com fibras simpáticas e parassimpáticas o trato urogenital de tal forma que num estudo experimental em ratas demonstraram os efeitos do estrogênio terapia no padrão miccional, contratilidade vesical e expressão dos receptores colinérgicos associados à idade dos animais

Chaparro et al. (1997) descreveram a associação do envelhecimento com o aparecimento ou piora de sintomas do trato urinário baixo assim como hiperatividade detrusora e sugeriram que a mudança nas propriedades do detrusor na bexiga hiperativa está associada com redução na relação de fibras nervosas e musculatura.

O objetivo da terapia medicamentosa é evitar a ocorrência de contrações musculares involuntárias, sem causar retenção urinária. Os principais mecanismos de ação envolvidos neste processo são: controle do sistema nervoso central; bloqueio periférico de receptores do sistema nervoso; ação relaxante direta sobre a musculatura detrusora e sobre outros moduladores da função contrátil.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido com 40 ratas Wistar, com três meses de vida e pesando entre 250 a 300 gramas. Os animais foram mantidos em um ambiente controlado (25°C, expostas diariamente a ciclos de luz de 12 horas) e tendo acesso livre à água e ração purina. O estudo foi conduzido de acordo com o guia para cuidados e uso de animais em laboratório publicado no *US National Health Institut* (NHI publicação nº 85-23, revisada 1985). O comitê de proteção animal da Universidade Estadual de Campinas aprovou o protocolo.

Os animais foram randomizados divididos em quatro grupos de 10 animais e submetidos aos seguintes procedimentos (Sartori, 1998):

- **Grupo 1** - controle
- **Grupo 2** - ooforectomia bilateral e após 4 semanas iniciada a reposição de 17 beta-estradiol (10 µg/Kg/dia, via subcutânea, durante 12 semanas)
- **Grupo 3** - procedimento *sham* e após 4 semanas, iniciado a administração de óleo de sésamo (0,2 ml/dia, via subcutânea durante 12 semanas)
- **Grupo 4** - ooforectomia bilateral e após 4 semanas iniciada a administração de óleo de sésamo (0,2 ml/dia, via subcutânea durante 12 semanas)

Procedimento de ooforectomia

A ooforectomia foi realizada utilizando-se anestesia com injeção intraperitoneal de tiopental sódio (40 mg/kg/peso). Os dois ovários eram pequenos, arredondados, com contornos irregulares encontrados em cada lado do abdômen, pouco abaixo dos rins. Cada ovário apresentava-se ligado a um corno do útero através das tubas uterinas.

TÉCNICA CIRÚRGICA:

1. O animal anestesiado era, então, deitado ventralmente, expondo-se a região dorsal para o cirurgião.
2. Era realizada uma pequena incisão dorsal na pele, entre o meio da região dorsal e o início da cauda.
3. Os planos musculares eram afastados até a cavidade peritoneal, e os ovários eram localizados logo abaixo da incisão, circundados por um grande conteúdo de gordura.
4. O ovário era mobilizado até a incisão cuidadosamente, sem manipulação direta, apenas mobilizando-o através da gordura peri-ovariana. A manipulação direta do ovário poderia levar à sua perfuração e conseqüente reimplante de tecido ovariano que poderia manter produção estrogênica residual após a ooforectomia. (figura 1)
5. A junção entre o útero e a trompa era, então, seccionada utilizando-se uma tesoura com pontas finas, envolvendo neste tempo também secção dos vasos sangüíneos e da gordura.
6. Não havia necessidade de ligaduras, pois o sangramento era mínimo ou inexistente. A musculatura não requereu sutura pois a incisão era pequena e a coaptação das bordas era satisfatória. A ooforectomia era realizada bilateralmente.



Figura 1- Procedimento de Ooforectomia. Ovário e gordura adjacente isolados antes da ressecção.

Dosagem de estradiol

A dosagem de estradiol sérico foi realizada imediatamente antes do sacrifício dos animais através de radioimunoensaio.

Coleta das amostras de tecido

O sacrifício dos animais foi realizado através de injeção intraperitoneal de sódio tiopental (60 mg/kg de peso corporal). A bexiga era seccionada no nível do colo e a parede anterior era longitudinalmente aberta desde o colo até o fundo vesical (figura 2).

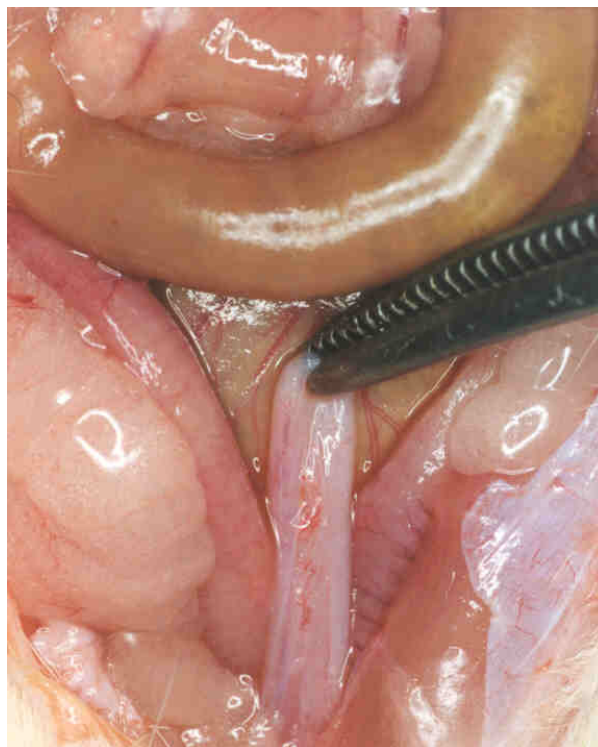


Figura 2- Isolamento e secção da bexiga no nível do colo vesical

A bexiga era pesada usando-se o método de Scherle (figura 3). Para tanto, o tecido era suspenso e submerso em solução fisiológica em frasco sobre uma balança de precisão. Depois deste procedimento, o tecido era esticado em uma espátula de madeira e presa através de alfinetes (figura 4) até que a avaliação microscópica pudesse ser realizada.



Figura 3- Demonstração do Método de pesagem de Scherle

As bexigas eram, então, imediatamente fixadas de formaldeído tamponado 10% (pH = 7.2) durante 48 horas. Subseqüentemente, o material era desidratado em séries de solução alcoólica crescente e diafanizado em xilol. Após a inclusão em parafina, secções de 7 μ m eram obtidas e coradas com anticorpo policlonal S-100 bovino, *Biogen*TM, EUA.

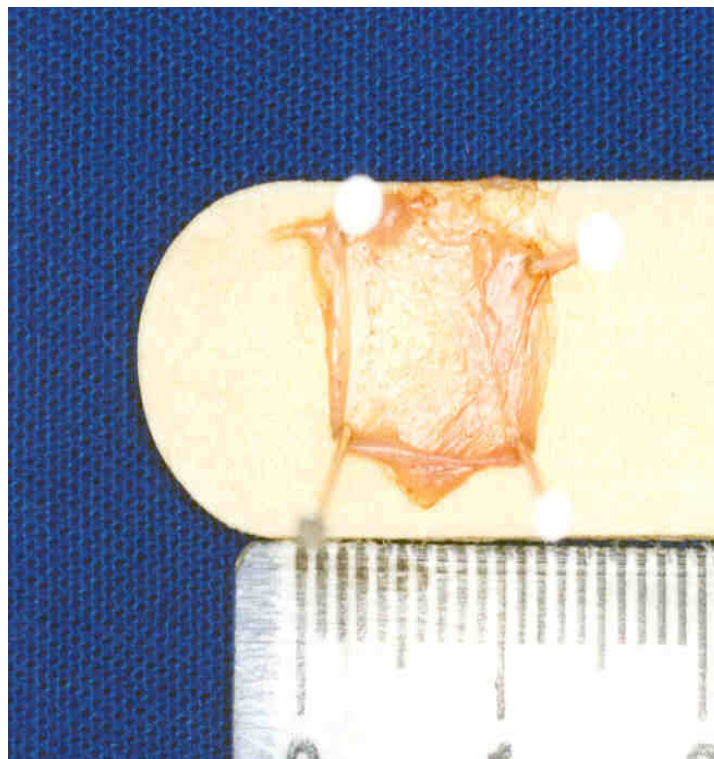


Figura 4- A bexiga foi estendida sobre uma espátula de madeira e presa com alfinetes, para facilitar a fixação em formalina 10%

Técnica de imunohistoquímica

Foi utilizado o protocolo Biogenesis Ltda. para desparafinização e coloração com Anticopo Policlonal S-100, isolado a partir de cérebro bovino apresentando reação cruzada importante para ratos. A proteína S-100 é assim denominada devido a sua diluição em sulfato amoníaco 100% .

Reagente fornecido

Frações de imunoglobulinas purificadas a partir de anti-soro de coelho, provida na forma líquida NaCl 0.1 mol/L, NaN_3 15 mmol/L, pH 7.2.

A reação de rotina da imunoperoxidase é dividida em duas etapas, na primeira ocorre um processo de desparafinização e na segunda a coloração propriamente dita.

Primeira etapa: desparafinização

1. Na fase de desparafinização a amostra do tecido era colocada no Xilol I e na estufa a 110° C por 30 minutos.
2. Este procedimento era sucedido de várias lavagens com água destilada. Era adicionado o Xilol II e III em temperatura ambiente.
3. Colocava-se álcool absoluto I, II e III em temperatura ambiente e várias lavagens eram efetuadas.
4. Acrescentava-se álcool 80% e álcool 50%, sendo realizadas várias lavagens com água corrente e destilada.
5. Era, então, realizado o bloqueio da peroxidase endógena com três trocas de cinco minutos cada em H₂O₂ 10%.
6. Era realizada nova lavagem em água corrente e destilada. Nesta etapa era realizada a digestão enzimática com pepsina 0.4% em HCl (ácido clorídrico) 0.1 M por 1 hora.
7. Eram adicionados os ácidos primários específicos e incubados em câmara úmida trinta minutos a 37°C e após mantidos na geladeira, 5°C durante toda a noite.

Segunda etapa: coloração

1. Para a etapa de coloração as lâminas eram retiradas da incubação com ácido primário e efetuadas três lavagens no agitador, em fosfato salino tamponado (PBS) de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
2. A amostra era seca com papel filtro e era adicionado o Sistema *Envision* Peroxidase.
3. Após a imersão em tampão, era preparada uma solução com 60 mg de diaminobenzidina (DAB), 100ml fosfato salino tamponado, 500 micrômetros de H₂O₂ (30%) e DMSO 1ml, a 37°, e as lâminas eram colocadas para corar durante cinco minutos à mesma temperatura.

4. A lâmina era lavada em água corrente destilada, e era contracorada com Hematoxilina de Mayer por trinta a sessenta segundos de acordo com sua concentração.
5. A seguir as lâminas eram novamente lavadas e imersas por alguns segundos em água amoniacal e água corrente destilada. As lâminas eram, então, desidratadas e montadas.
6. O anticorpo policlonal S-100 era, então, adicionado a diluição de 1:400. (figura 5)

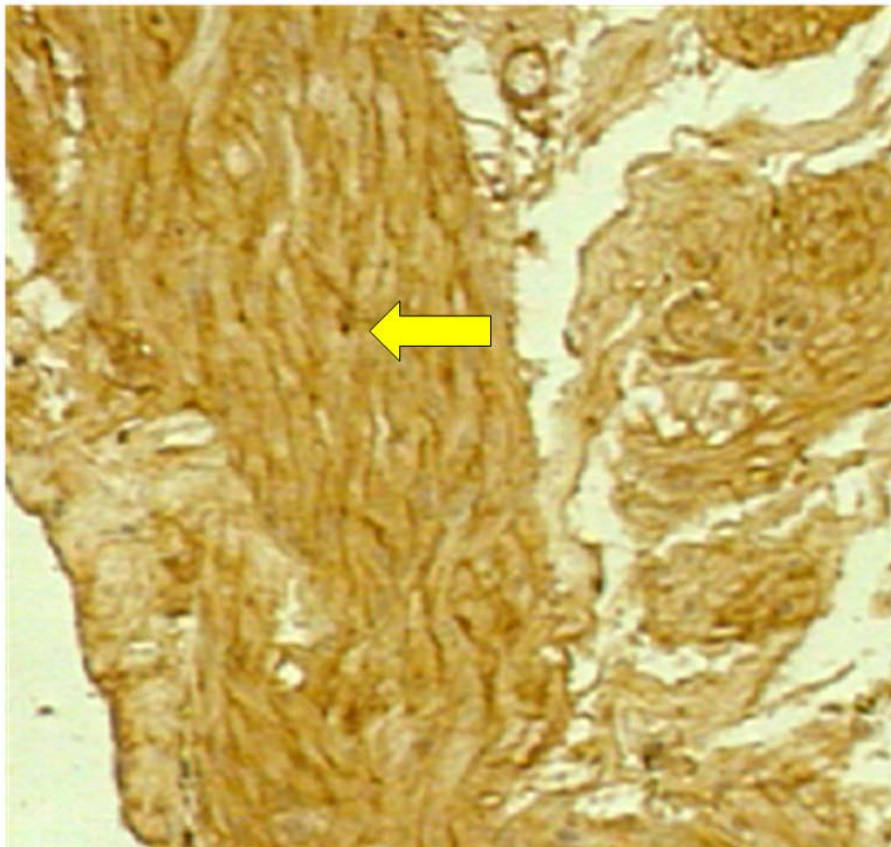


Figura 5- Fotomicrografia da parede vesical corada com anticorpo policlonal S-100. Fibras nervosas evidenciadas nos pontos marrom – escuro (seta amarela). (aumento 400 vezes)

A quantificação morfométrica

A contagem estereológica do volume absoluto das fibras foi determinado pela interposição do sistema-teste G 50 integrado na lente ocular Achro PlanTM 100X – 1,25, sobre a imagem morfológica capturada pelo microscópio (figura 6).

A densidade volumétrica é a densidade relativa ocupada pela estrutura no tecido e o volume absoluto é o volume total destas estruturas. O método estereológico determina parâmetros quantitativos tridimensionais das estruturas anatômicas baseados em secções bidimensionais. Baseados no princípio de Delesse (1848), que estabelece a relação entre áreas de uma determinada estrutura e a superfície da qual este órgão foi seccionado como sendo a mesma relação existente entre o volume da estrutura e o volume total do órgão.

A Fórmula $V_v = P_p / P_t \times 100\%$ foi utilizada para calcular a densidade volumétrica das fibras nervosas onde V_v é a densidade volumétrica; P_p é o número de pontos da estrutura em estudo (fibras nervosas) e Point test number. O volume absoluto é obtido usando a fórmula $V(\text{fibras nervosas}) = V_v(\text{fibras contadas no sistema-teste}) \times V(\text{bexiga})$. O $V(\text{bexiga})$ é considerado o peso da bexiga porque a gravidade específica da solução salina é aproximadamente 1.0048 e o peso da bexiga foi aferido utilizando-se o método de Scherle.

As avaliações quantitativas foram obtidas utilizando o microscópio BX 50. A quantificação foi realizada com uma magnificação de 400x utilizando a grade de teste *Integrating Eyepiece G50* (Achro PlanTM). Dez campos microscópicos foram analisados randomicamente em cada grupo.

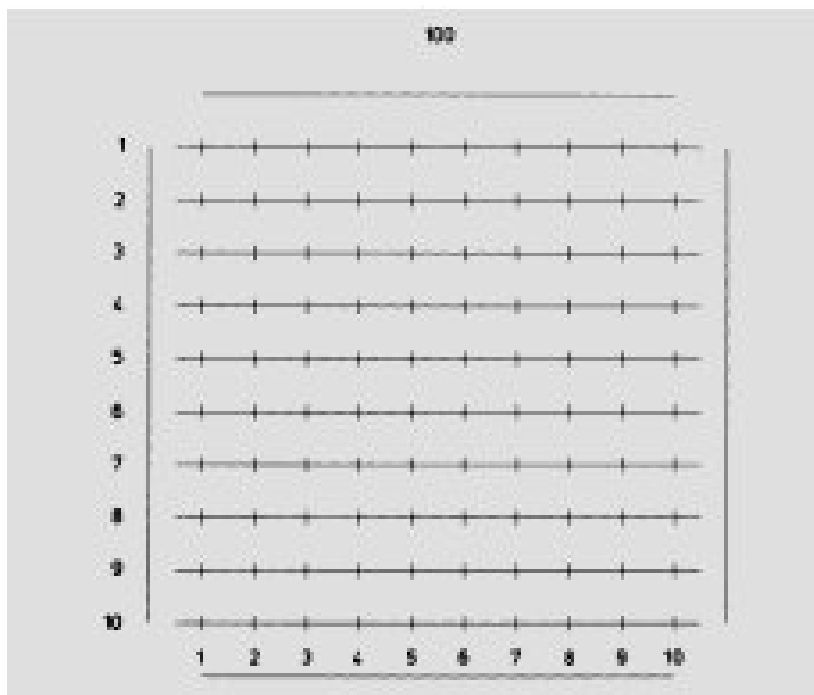


Figura 6- Grade do Sistema G50, para avaliação estereológica

Análise estatística

Como os resultados estereológicos apresentam-se com variabilidade discreta o teste de ANOVA (análise de multivariância) e o teste não paramétrico de *Newman-Keuls* para comparações múltiplas foi utilizado para avaliar as diferenças entre as amostras independentes (statistic para windows. Stat soft, inc,1995). A probabilidade para $p < 0,05$ foi assumida como critério de significância.

5- RESULTADOS

Características gerais

As bexigas não demonstraram diferenças macroscópicas entre os grupos.

Todos os animais apresentaram aumento de peso durante o experimento a média de ganho de peso foi de 62 mg para todos os grupos (Tabela 1).

Tabela 1- Ganho de peso e níveis de estradiol sérico nos grupos

Grupo	Peso antes do experimento		Peso após o experimento		Estradiol sérico antes do sacrifício	
	Média (g)	IC 95%	Média (g)	IC 95%	Média (pg/ml)	IC 95%
1	260	250 - 268	325	315 - 331	74	68 - 79
2	282	277 - 288	344	338 - 353	78	70 - 84
3	270	263 - 278	325	317 - 332	72	66 - 78
4	268	260 - 275	330	322 - 340	17*	

* $p < 0,05$. A concentração de Estradiol sérico neste grupo foi menor

A ooforectomia e a reposição com estradiol não apresentaram efeitos no volume vesical. A despeito dos procedimentos variados, o volume vesical permaneceu similar para todos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2- Alterações no volume vesical após o experimento

Grupos	Volume da bexiga após cistectomia	
	Média (g)	IC 95%
1	62,00	58,41 - 67,58
2	71,50	58,68 - 76,31
3	61,50	55,68 - 64,71
4	67,50	62,88 - 84,11

p value > 0,23 IC 95%: intervalo de confiança; p: probabilidade (teste de Newmann-Keuls)

As concentrações de estradiol sérico, imediatamente antes do sacrifício no grupo ooforectomizado sem reposição de estradiol, foi menor que 17 pg/ml, que corresponde ao limite inferior de sensibilidade do método aplicado. Nos grupos não ooforectomizados e ooforectomizados submetidos à reposição hormonal a média da concentração hormonal foi 76 pg/ml (variando entre 66 – 87pg/ml) (tabela 1).

Parâmetros estereológicos

Na tabela 3 estão resumidos os resultados estereológicos. A densidade volumétrica das fibras nervosas na bexiga das ratas foi a seguinte:

Tabela 3- Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls entre os grupos para concentração relativa / densidade volumétrica de fibras nervosas

Grupo 1 versus Grupo 4	p < 0.001
Grupo 1 versus Grupo 3	p > 0.05
Grupo 1 versus Grupo 2	p > 0.05
Grupo 2 versus Grupo 4	p < 0.001
Grupo 2 versus Grupo 3	p > 0.05
Grupo 3 versus Grupo 4	p < 0.001

IC 95%: intervalo de confiança; p: probabilidade (teste de Newmann-Keuls)

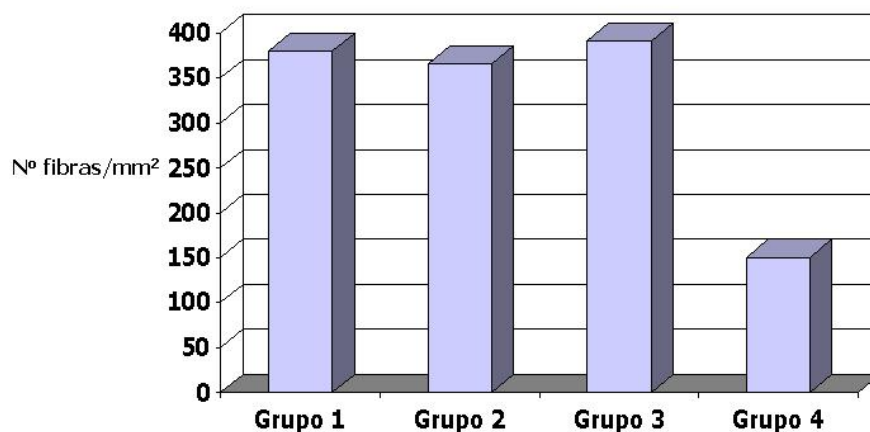


Gráfico 1- Volume absoluto de fibras nervosas vesicais após o experimento

No presente estudo experimental, que se propôs a quantificar a densidade volumétrica das fibras nervosas na parede vesical, através do método estereológico, foram encontrados os seguintes resultados: quando comparados, os grupos normo estrogênicos (grupo 1 - grupo controle, grupo 2 - ooforectomia + reposição hormonal com 17 β -estradiol e grupo 3 - procedimento SHAM + óleo de sésamo), através de parâmetros estereológicos com o grupo hipoestrogênico (grupo 4 - ooforectomia bilateral sem reposição hormonal) encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos com concentração normal de estrogênio e o grupo hipoestrogênico.

6- DISCUSSÃO

6.1- Aspectos gerais do envelhecimento vesical na mulher

O aparecimento de alterações urogenitais no período pós-menopausa tem sido objeto de vários estudos. Vários problemas como incontinência urinária de esforço, disfunções miccionais e prolapsos pélvicos têm representado importante fração na literatura médica atual. Este fato é justificado por sua alta prevalência, possibilidade de aumento da longevidade populacional, avanços nos recursos metodológicos e técnicos para o estudo das alterações patológicas do envelhecimento e suas repercussões neuroendócrinas.

A correlação entre este período marcado pela hipoestrogenia, e as altas taxas de incidência e prevalência de problemas urinários, sugerem que os hormônios sexuais exercem importantes efeitos no trato genitourinário feminino (Versi, 1984), de tal forma que a compreensão de suas correlações torna-se necessária para o planejamento de seu diagnóstico e terapêutica.

A partir da premissa de que a existência de receptores torna um órgão sensível à ação de determinados hormônios, sabe-se que a aqueles encontrados no trato urinário são sensíveis à ação estrogênica, em todas as fases do ciclo menstrual, em contraste com endométrio e vagina, que apresentam uma expressão cíclica. Este dado sugere que o trato urinário permanece receptivo à influência hormonal, independente dos seus níveis. (Sjoberg, 1989).

Alguns autores enfatizam, ainda, que tipos específicos de receptores (α e β) podem apresentar diferenças de expressão conforme o subtipo encontrado no tecido.

Dentre as evidências associando os baixos níveis de estrogênios com aumento da frequência de disfunções miccionais e de infecções urinárias recorrentes podem ser enumerados vários estudos como, por exemplo, os de Hextall et al. (2000); Klutke et al., (1985), Wehba et al. (1988), os quais relatam taxas significativamente maiores destes problemas nas mulheres no período pós-menopausa

6.2- Ação estrogênica, colágeno, envelhecimento vesical e alterações neurológicas vesicais

Embora o mecanismo pelo qual o estrogênio atua sobre o metabolismo do colágeno vesical ainda não esteja compreendido, numerosos estudos indicam que os hormônios sexuais femininos em concentrações normais, principalmente o 17 β -estradiol, aceleram o acúmulo de inibidores da collagenase, mantendo os níveis dos precursores desta enzima baixos e conseqüentemente a concentração do colágeno tissular dentro de parâmetros normais.

O desenvolvimento normal do sistema nervoso central e periférico humano é um processo complexo. O crescimento do sistema nervoso periférico é regulado por componentes da matriz extracelular. Embora a laminina seja o principal componente extracelular há outros componentes que também apresentam papel significativo, entre eles o colágeno I e IV, os quais têm sido demonstrados como substratos efetivos no crescimento neuronal, além de influenciar, diretamente, a mielinização dos nervos periféricos. A relação do estradiol com o metabolismo da matriz extracelular, que oferece as condições de sobrevivência neuronal periférica, parece ser um elemento importante na compreensão das modificações funcionais da bexiga no período pós-menopausa, uma vez que este órgão se apresenta como um grande sincício funcional constituído de uma concentração significativa de receptores para estrogênio, elementos colagenosos, fibras musculares e principalmente, fibras nervosas.

Portanto, o papel do estradiol no sistema nervoso se apresenta associado à diferenciação e proliferação celular; sobrevivência neuronal; sinaptogênese; neuroproteção; homeostase do cálcio e atividade antioxidante.

Recentemente, alguns estudos revelaram a importância da remodelação da matriz extracelular e do tecido conjuntivo como um todo, enfatizando a origem de algumas doenças associadas com defeitos na sua síntese ou degradação. Estes autores apontam as enzimas metaloproteases como importantes reguladoras do metabolismo da matriz extracelular, principalmente do colágeno.

Estas enzimas estão representadas em grupos pelas collagenases, estromelisinases, gelatinases e elastases. Há cerca de dezessete tipos de metaloproteases, dentre as quais quatro, do grupo das collagenases, são capazes de degradar colágenos fibrilares, ficando os outros grupos com maior afinidade para degradação dos componentes da membrana basal.

A completa regulação deste mecanismo enzimático não está totalmente definida. A compreensão dos sítios específicos de ligação destas enzimas e os diferentes tipos de colágeno, bem como a expressão dos diferentes tipos de receptor para estrogênio podem ser úteis na compreensão dos diferentes padrões do metabolismo do colágeno no período pós-menopausa.

Sato et al. (1991) relataram a associação de níveis normais de estrogênio com a manutenção dos níveis corporais de colágeno. O mesmo autor verificou que a maior atividade das collagenases também se correlacionou com baixas concentrações de hormônios sexuais femininos, ocorrendo diferenças nas respostas tissulares à ação destas enzimas.

A pele, abdome, musculatura pélvica e útero apresentam importante taxa de redução do colágeno total no período climatérico. De outra forma, as alterações no colágeno em resposta à ação estrogênica no trato urinário ainda permanecem por ser definidas, uma vez que há controvérsias na literatura quanto aos resultados obtidos em estudos clínicos e experimentais.

Hashimoto et al. (1999) detectaram, em coelhas, diminuição da densidade do tecido conjuntivo da bexiga. Estes achados divergem de Dambros et al. (2001) que, analisando fibras colágenas e elásticas da parede vesical de ratas ooforectomizadas, observaram que a condição de hipoestrogenia não induziu a modificações na concentração do tecido conjuntivo colágeno e elástico.

Neste contexto, a presente pesquisa buscou criar um ambiente adequado para a avaliação dos possíveis fenômenos associados à denervação vesical e a inferência de suas conseqüências.

6.3- Considerações sobre o modelo experimental

A utilização de ratas ooforectomizadas para estudo da ação dos baixos níveis de estrogênio sobre o trato urinário feminino representa modelo experimental amplamente reconhecido. (Saville, 1969; Diep et al., 1999). Este fato, associado à facilidade de aquisição/alojamento dos animais e à necessidade de elevado número de ratas para o desenvolvimento desta pesquisa, levou à opção pela utilização destes animais.

O tamanho da amostra foi determinado de acordo com critérios estereológicos, para que a análise dos resultados não fosse comprometida por número insuficiente de animais (Hally, 1964). A dose, a frequência e a via de administração da medicação basearam-se em estudos prévios, embora vários esquemas, e com tempo de uso variado, tenham sido encontrados. (Sartori, 1998; Diep et al., 1999).

6.4- Aspectos gerais do método estereológico

6.4.1- Considerações sobre o método de análise

O método de escolha para obter a estimativa morfométrica das fibras foi a estereologia, devido à maior sensibilidade do método em relação aos sistemas de avaliação quantitativa através da análise de imagem ou de programas de computador. (Mathieu et al, 1981; Cotrin et al, 1990). A densidade volumétrica é um parâmetro estereológico cujos resultados são confiáveis, em decorrência da pequena variação dos mesmos, independentemente do preparo histológico do material e da experiência do pesquisador. (Cruz-Orive & Weibel, 1990).

A Estereologia é uma ciência que tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais, valendo-se da geometria e da estatística para esta aferição. Delesse (1848) lançou as primeiras idéias que serviram a fundamentação da estereologia, provando que a relação entre as áreas de determinado mineral na superfície de corte da rocha é a mesma daquela que existe entre o volume do mineral e volume total da rocha. A maior parte dos estudos

estereológicos obtém dados diretamente da microscopia ótica e microscopia eletrônica, trazendo como resultado a possibilidade de elucidação das composições celulares e teciduais.

Enquanto as técnicas morfométricas as estruturas anatômicas devem ser medidas com escalas aferidas, a estereologia baseia-se em principais geométricos e estatísticos (Mandarin-de-Lacerda,2003).

Os estudos estereológicos nem sempre estão interessados em determinar valores absolutos, como o expresso neste estudo em relação à densidade volumétrica, que refere uma concentração relativa de fibras nervosas em um determinado segmento e não o número total de fibras nervosas vesicais.

Assim bexigas de diferentes tamanhos poderão apresentar um número diferente de fibras nervosas sem que isto possa ser generalizado dentro de uma espécie, pois refletem diferenças individuais. Por outro lado, ao determinar-se a densidade volumétrica se obtém um valor relativo, que pode ser utilizado para indivíduos diferentes, pois representa uma idéia de proporção (Delesse, 1966).

A estereologia se utiliza de sistemas-teste para sua aferição. Um sistema teste é um conjunto de linhas (retas ou curvas) e pontos. Este deve ser superposto à imagem morfológica para a contagem estereológica. Pode-se construir os sistemas-testes com arranjo regular ou não isto é, aleatório. Existem diversos sistemas-teste propostos para variados fins.

Tradicionalmente, estes são desenhados com retas, ou segmentos de reta, apresentando arranjos triangulares, quadrados ou hexagonais. Cada um destes arranjos determina as características básicas do sistema-teste. O sistema teste chamado *Integrating Eyepiece G50 (multi purpose test system)* (Weibel et al, 1966) foi utilizado no presente estudo por se adequar à avaliação de estruturas puntiformes ou de pouco comprimento. A grade do sistema *Integrating Eyepiece G50* é sobreposta à transmissão da imagem microscópica ou através de lentes microscópicas oculares com sistema previamente gravados.

O preparo das lâminas deve oferecer a melhor coloração para a estrutura em estudo, a fim de que estas possam ser plenamente reconhecidas e aprimorem a acuracidade do teste.

No presente experimento, foi utilizado o marcador para imunohistoquímica anticorpo policlonal S-100, apresentando reação cruzada de forte intensidade para ratos. A proteína S-100 é assim denominada devido a sua diluição em sulfato amoníaco 100%. Inicialmente considerada específica do sistema nervoso, atualmente sua aplicabilidade é reconhecida como marcador glial, detectando astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais, células de Schwann e células satélite. Vários trabalhos na literatura corroboraram sua imunoreatividade confiável na detecção de fibras nervosas, que foi o escopo principal deste estudo.

Inicialmente considerada específica do sistema nervoso, atualmente sua aplicabilidade é reconhecida como marcador glial, detectando astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais, células de Schwann e células satélite. Pode também ser aplicado como marcador de células de origem não-neural como condrócitos, adipócitos, células de Langerhans, melanócitos entre outras. No contexto da patologia tumoral, se pode observar que é uma proteína amplamente expressada por neurinomas, neurofibrossarcomas, mas nos tumores cerebrais, sua concentração decresce à medida que aumenta o grau de anaplasia ou de desdiferenciação. S100 é a denominação de uma família multigênica de proteínas Ca^{2+} ligantes de baixo peso molecular (Mr entre 9000 e 13 000). Esta família compreende 19 membros que são diferentemente expressos em um grande número de tipos celulares. Assim, a S100B (anteriormente chamada S100 β) é mais abundante nas células gliais do sistema nervoso central e periférico, melanócitos, condrócitos e adipócitos, enquanto que a S100A1 (anteriormente chamada S100A/ S100 α) é mais abundante nos cardiomiócitos, em células musculares esqueléticas de movimentos lentos, células salivares epiteliais e células renais. A S100B é ainda encontrada em células tumorais e subpopulações de neurônios, enquanto a S100A1 foi encontrada em neurônios do hipocampo. A S1006 é expressa nos fibroblastos e células da musculatura cardíaca e lisa.

Os membros da família S100 estão relacionados com a regulação Ca^{2+} dependente em várias atividades intracelulares, como por exemplo, fosforilação protéica (incluindo transformações neoplásicas) e diferenciação.

Ferrandino & Grimaldi, (1995), utilizaram o anticorpo S-100 para estudar a parede vesical de ratas pois esta proteína é um marcador confiável das fibras nervosas mielínicas.

Honma, (1994) utilizou a proteína S-100 para estudar a região paraganglionar da bexiga urinária em casos de autópsias, tendo demonstrado imunoreatividade confiável na detecção de fibras nervosas.

6.5- Comentários sobre os achados estereológicos

No presente estudo experimental, que se propôs a quantificar a densidade volumétrica das fibras nervosas na parede vesical, através do método estereológico, foram encontrados os seguintes resultados: quando comparados, os grupos normo estrogênicos (grupo 1 - grupo controle, grupo 2 - ooforectomia + reposição hormonal com 17 β -estradiol e grupo 3 - procedimento SHAM + óleo de sésamo), através de parâmetros estereológicos com o grupo hipoestrogênico (grupo 4 - ooforectomia bilateral sem reposição hormonal) encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos com concentração normal de estrogênio e o grupo hipoestrogênico.

Este fato indica maior densidade volumétrica de fibras nervosas das ratas normoestrogênicas, quando comparadas com o grupo de ratas que permaneceu hipoestrogênico.

Neste estudo evidenciou-se a associação entre os baixos níveis estrogênicos e a denervação vesical, o que poderia sugerir uma correlação entre o aparecimento dos sintomas miccionais, como a hiperatividade idiopática, por exemplo, e a instalação do período da menopausa, quando marcadamente se encontra a falência ovariana e descenso hormonal.

A despeito da existência de doenças neurológicas estabelecidas, que poderiam associar-se ao aparecimento da hiperatividade do detrusor em qualquer fase da vida, a denervação vesical pode produzir padrões de atividade detrusora com distribuição irregular, na qual áreas de hipoatividade se encontram entremeadas com áreas de hiperatividade detrusora. Padrão este que dificultaria a comprovação donexo causal entre a hipoestrogenia e a atividade patológica detrusora, pois o fenômeno de envelhecimento fisiológico é multifatorial e outros elementos como o estresse oxidativo, isquemia e controle genético da apoptose poderiam estar associados a esta condição.

Distúrbios dos nervos periféricos e tecidos podem produzir hiperatividade vesical e vários modelos tem sido desenvolvidos para mimetizar estas alterações. Estes modelos são importantes na compreensão dos processos relativos ao aparecimento e repercussões fisiopatológicas da hiperatividade detrusora idiopática e neurogênica, de denervações parciais da bexiga, obstrução infravesical, diabetes e cistite intersticial.

Muitas alterações são descritas na inervação periférica e nos reflexos miccionais, como por exemplo, modificações macroscópicas na estrutura da parede vesical nos casos de hiperatividade detrusora. Alguns estudos demonstraram padrão de denervação das bandas musculares em proporções distintas, entremeadas com áreas normais. Estudos experimentais podem apresentar diferenças em função da neurofisiologia específica do modelo animal escolhido. O padrão de denervação pode estar associado com áreas de tecido conjuntivo com colágeno e elastina em proporções variáveis. Nas áreas completamente denervadas a hipertrofia das células musculares lisas tem sido demonstrada. Estudos experimentais eletrofisiológicos têm sugerido que a uma reorganização das vias miccionais dependente do sítio e extensão da lesão neurológica (Williams et al., 1993)

6.6- Perspectivas

Cada vez mais tem sido necessária a compreensão das causas do aparecimento de sintomas urogenitais na mulher no período pós-menopausa. Com a finalidade de avaliar a importância dos mecanismos neuroendócrinos envolvidos nesta fase, há necessidade de se

desenvolver mais estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* que possam resultar em novos conhecimentos acerca da fisiopatologia e das correlações entre os componentes que interagem nesta circunstância.

A utilização de modelos animais sempre é questionada quanto à capacidade destes estudos realmente mimetizarem situações e conclusões transponíveis à realidade humana.

Na tentativa de simular o ambiente da menopausa este estudo buscou oferecer uma alternativa de modelo experimental para a compreensão do aparecimento dos sintomas miccionais em indivíduos normo e hipoestrogênicos.

Porém, há necessidade de compreensão e estudo de outras lesões que possam estar associadas ao envelhecimento vesical.

Possivelmente, a suscetibilidade genética e a regulação do ciclo celular poderão ser fontes de resposta à compreensão do envelhecimento vesical e suas repercussões clínicas.

7- CONCLUSÕES

1. A ooforectomia bilateral, em ratas, induziu a menor densidade volumétrica de fibras nervosas na parede vesical.
2. A administração de estradiol no grupo castrado apresentou diferença significativa na densidade volumétrica das fibras nervosas avaliadas através do método estereológico, em relação aos animais castrados sem reposição.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams P, Blaivas JG, Stanton SL, Anderson JT. The standardization of terminology of lower urinary tract function recommended by the International Continence Society. *Int Urogynecol J*. 1990; 1:45.

Batra, S.C., Iosif, C.S. Female urethra: a target for estrogen action. *J. Urol.*1983; 129: 418-420.

Blakeman PJ, Hilton P, Bulmer JN. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU Int*. 2000; 86(1): 32.

Broclehurst, JC. Urinary incontinence in old age: helping the general practioner to make a diagnosis. *Gerontology*.1990, 36 (suppl. 2): 3 – 7.

Brown,J.S.; Grady, D.; Ouslander,J.G. Prevalence of urinary incontinence and associated risk factors in postmenopausal women. Heart & Estrogen / Progestin replacement Study (HERS) Research Group. *Obstet.Gynecol*. 1999, 94:66-70.

Cardozo, LD, Kelleher, CJ. Sex hormones, the menopause and urinary problems. *Gynecol. Endocrinol*. 1995, 9: 75 – 84.

Chaparro L.P., Llopis J.A.L., Del Valle A.T., Martinez F.L., Sanchez E.N., López V.M., Puentes C.F., López F.G. Patrones de disfunción: bases morfológicas y ultraestruturales de la inestabilidad vesical del varón. *Arch Esp Urol*. 1999, 52, 5: 479.

Chaparro L.P., Díaz A.S., Casado J.S., Influencia del envejecimiento en el funcionalismo del detrusor en el varón. *Arch Esp Urol*. 1997, 50, 6: 579 – 583.

Charlton R.G., Morley A.R., Chambers P., Gillespie J.I. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. *BJU International*. 1999, 84; 953-960.

Cotrim, A.E.I.; Pardi, P.C.; Sakumoto, S.; Simões, M.J. – Morfometria e estereologia: algumas considerações gerais. *Acta Cir. Bras*. 1990, 5:28-30.

Cruz-Orive L M e Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990, 258: L148-56.

Dambros, M. Influência da ooforectomia e da reposição de estradiol no volume das fibras colágenas e no sistema elástico da bexiga. (Dissertação de Mestrado) Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2001.

Delesse M. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. Ann Mines 1848; 13: 379-85.

Diep, N. e Constantinou CE. Age dependent response to exogenous estrogen on micturition, contractility and cholinergic receptors of the rat bladder. Life Sci 1999; 64(23): PL279-89.

Dixon JS, Jen PYP, Gosling JA. The distribution of vesicular acetylcholine transporters in the male genitourinary organs and its co-localization with neuropeptide Y and nitric oxide synthetase. Neurourol Urodin. 2000, 19: 185-94.

Eika, B., Salling, L. N., Christensen, L. L. et al. Long-term observation of the detrusor smooth muscle in rats: its relationship to ovariectomy and estrogen treatment. Urol Res. 1990, 18: 439.

Ekström, J., Iosif, C. S., Malmberg, L. Effects of long-term treatment with estrogen and progesterone on in vitro muscle responses of the female rabbit urinary bladder and urethra to autonomic drugs and nerve stimulation. J Urol. 1993, 150: 1284.

Fantil, J.A.; Bump, R.C.; Robinson, D. Efficacy of estrogen supplementation in the treatment of urinary incontinence. The Continence program for Woman Research Group. Obstet.Gynecol. 1996, 88:745-749.

Ferrandino I, Grimaldi M.C., Immunoreactive nerves in the urinary bladder of the rat. Eur J Histochem. 1995, 39(2): 127 – 132.

Fraga, R. Influência da Ooforectomia e da reposição de estradiol no volume das fibras colágenas tipo IV da membrana basal vesical, em ratas. (Dissertação de Mestrado). Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas., 2003.

Geirsson G, Fall M, Lindstom S. Subtypes of overactive bladder in old age. Age Aging. 1993, 22:125.

- Gilpin S.A., Gilpin C.J., Dixon J.S., Gosling J.A., Kirby R.S. The effect of age on the autonomic innervation of the urinary bladder. 1986, 58, 378 – 381.
- Jabs CFI, Stanton SL. Urge Incontinence and Detrusor Instability. *Int Urogynecol J*. 2001, 12:58.
- Hally A. A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. *Quaterly J Microsc Sci* 1964; 105: 503-517.
- Hashimoto T.; Ishigooka M.; Zerman DH. Effects of estrogen and progesterone on urinary bladder in female rabbit: evaluation by quantitative morphometric analysis. *Urology*. 1999, 53:642-646.
- Hextall A. Oestrogens and lower urinary tract function. *Maturitas* 36: 83-92, 2000.
- Honma K., Paraganglia of the urinary bladder. An autopsy study. *Zentralbi Pathol*. 1994,139(6): 465 – 469.
- Iosif, C,S, ; Batra, S.; EK, Astedt, B. Estrogen receptors in the human female lower urinary tract. *Am. J. Obstet Gynecol*. 1981, 141: 817-820.
- Ingelman-Sundberg, A.; Rosén, J. Gustafsson, S.A.; Carlstrom, K. – Cytosol estrogen receptors in the urogenital tissues in stress-incontinence women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 1981, 60: 585-586.
- Klutke, J.J. & Bergman, A. Hormonal influence on the urinary tract. *Urol. Clin. North Am*. 1985, 22: 629-639.
- Kulak, C.A. & Bilezikian, J.P. Osteoporosis: preventive strategies. *Int J Fertil Women*, 1998, 43, 56-64.
- Leclair DM.; Anandarajah G. Effects of estrogen deprivation – vasomotor symptoms, urogenital atrophy and psychobiologic effects. *Clinics in Family Practise*. 4: 1, 2002.
- Makela S.; Strauss L.; Kuiper G.; Valve E.; Santti R, Gustafsson J.A. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2000, 164:109-16.

Mandarim-de-Lacerda C.A: Stereological tools in biomedical research. An. Acad. Bras. Ciênc. 2003, 75:4 .

Mathews R, Wills M, Perlman E, Gearhart JP. Neural innervation of the newborn exstrophic bladder: An immunohistochemical study. J Urol. 1999, 162, 506 – 508.

Mathieu, O.; Cruz-Orive, L.M.; Hoppeler, H.; Weibel, E.R. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. J. Microsc. 1981, 121: 75-88.

Miller M.M., Franklin, K.B.J. Theoretical basis for the benefit of postmenopausal estrogen substitution. Experimental Gerontology. 1999, 34, 587 – 604.

Miodrag, A.; Castleden, C.M.; Guayanés, T.R. Sex hormones and the female urinary tract. Drugs, 1988, 36: 491-504.

Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Enmark E, Curtis E, Gustafsson JA, Maggi A.: Estradiol induces differential neuronal phenotypes by activating estrogen receptors α or β . 141(5): 1839-45, 2000.

Philips M: Fetal catecholamines. Am J Obstet Gynecol. 1983, 146: 840.

Resnick NM, Yalla SV, Laurina E. The pathophysiology of urinary incontinence among institutionalized elderly persons. N Engl J Med. 1989, 320:1.

Salmon, U.J.; Walter, R.I.; Geist, S.A. The use of estrogens in the treatment of dysuria and incontinence in post menopausal women. Am. J. Obstet. Gynecol. 1941, 42: 845-851.

Sartori, M.G.F. – Análise quantitativa do colágeno e das fibras musculares da bexiga e da uretra de ratas castradas, antes e durante reposição por estrogênios e progestogênios. (Tese – Doutorado). São Paulo (SP): UNIFESP, 1998.

Sartori, M.G.F.; Barakat, E.C., Girão, M.J. Menopausal genuine stress urinary incontinence treated with conjugated estrogens plus progestogens. Int. J. Gynecol. Obstet. 1995, 49: 165-169.

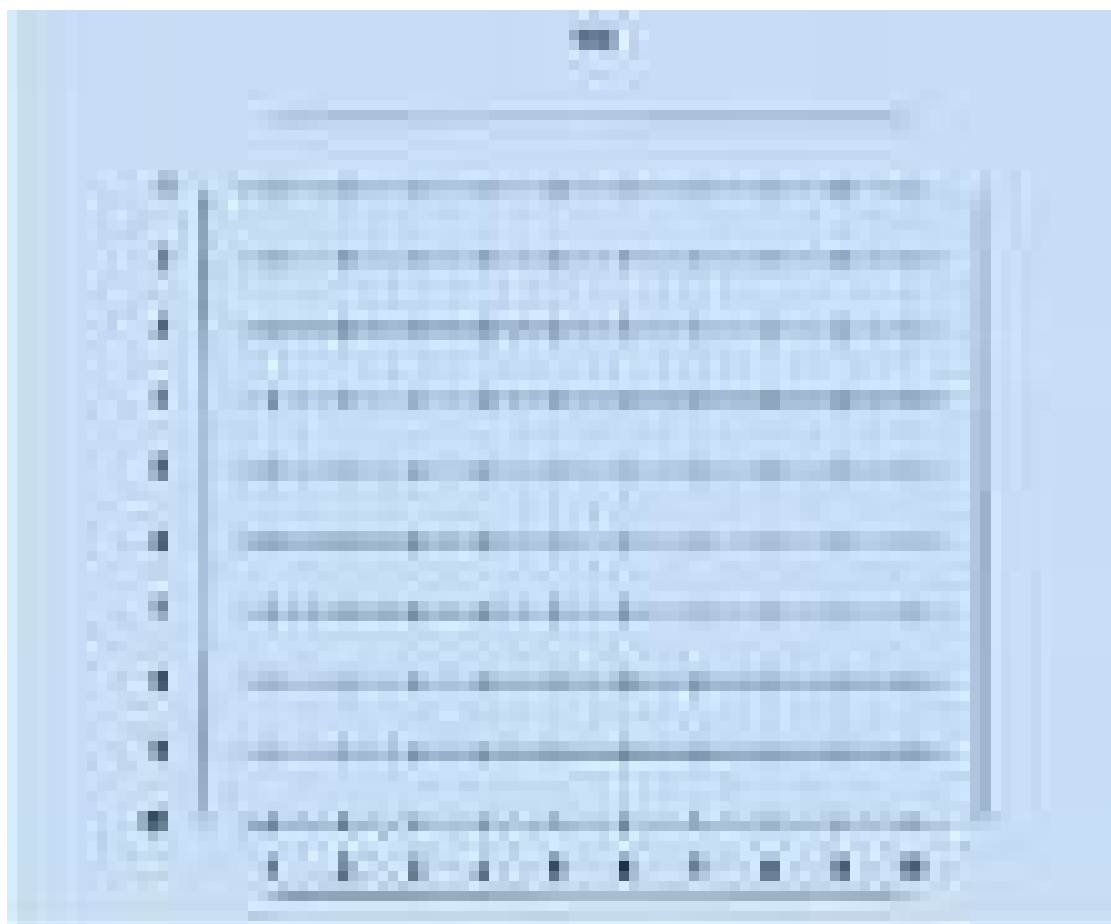
Saville, P.D. Changes in skeletal mass and fragility with castration in rat: a model of osteoporosis. J.AM. Geriatr. Soc. 1969, 17:155-166.

- Sato I., Ito A., Mori Y., Yamashita K., cols: Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol - 17 β . Arch Biochem Biophys. 1991, 275: 211-216.
- Schaffer J., Fantil JA. Urogenital effects of the menopause. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 1996, 10: 401-417.
- Sjoberg, I.; Rylander, E.; Von Schoultz, B. Menstrual variation of estrogen receptor content in vaginal tissue. Gynecol. Obstet. Invest. 1989, 27:48-51.
- Susset, J.G.; Servot-Viguiet, D.; Lamy, F.; Madernas, P.; Black, R. Collagen in 155 human bladders. Invest. Urol. 1978, 16: 204-206.
- Versi E; Cardoso L.; Brincat M.; Studd J., Lower Urinary tract symptoms, urodynamic findings and skin collagen in normal postmenopausal women. Maturitas 6: 204. 1984.
- Van Poppel H, Stessens R, Van Damme B, Carton H. Innervation density in the stroma and the muscular tunica in biopsies of the normal and pathologic bladder. Ann Urol. 1989, 23(5); 398 – 401.
- Vaughan CW, Satchel PM: Urine storage mechanisms. Prog Neurobiol. 1995, 46: 215.
- Wehba, S.; Ferreira, J.A.S.; Grinbaum, M. L.; Yoneda, V.R.; Fernandes, C.E.; Azevedo, L.H. Efeitos clínicos e virológicos da administração de estrogênio percutâneo em mulheres menopausadas. Reprod. Clim. 1997, 12: 194-196.
- Weibel, E.R.; Kistler, G.S.; Scherle, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. J. Cell Biol. 1966, 30: 23-38.
- Wilson I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how they managed? A population – based prevalence study. BJU International. 2001, 87(9): 760-6.
- Williams JH, Turner WH, Sainsbury GM et al. Experimental model of bladder outflow tract obstruction in the guinea-pig. BJU. 1993, 71: 543-44.

Yarnell, J.W.G.; Voyle, G.J.; Richards, C.J.; Stephenson, TP. The prevalence and severity of urinary incontinence in woman. J Epidemiol. Comm. Health. 1981, 35: 71-74.

Zulio, M.A.; Oliva, C.; Falconi, G. Efficacy of estrogen therapy in urinary incontinence. A meta-analytic study. Minerva ginecol. 1998, 50:199-205.

9- ANEXO



10- APÊNDICE

